

ダリヤに発生した Tomato spotted wilt virus

(キク科植物のウイルスに関する研究 第3報)

井上忠男・井上成信

1970年5月に岡山県庄村(現在倉敷市)の一農家が栽培したダリヤ(品種光明)に、葉に激しいえそ輪紋症状を呈するウイルス病が多発した。病原ウイルスを分離して調べたところ、国内では未記録の Tomato spotted wilt virus (TSWV) であることが判明した。

TSWV は1919年にオーストラリアで最初に記載された病害であり、その後世界各地で報告され、種々の栽培植物に発生して大きな被害をもたらす場合の多い重要なウイルスとされている。日本では横浜植物防疫所の輸入検疫隔離栽培中のダリヤ(品種 Envy) から検出され、ウイルスの諸性状が報告された(末次, 1967, 1969)が、国内産の植物での発生についてはまだ記録がない。本報告は今回分離同定された TSWV の性状について記述したものである。

この研究にあたり終始実験に協力を惜しまれなかった光畑興二氏に感謝の意を表わす。

実験材料と方法

1970年5月に採集したダリヤ(品種光明)のえそ輪紋症状株には TSWV のほかにダリヤモザイクウイルス(DMV)と思われる球状粒子を含むものもあったが、電子顕微鏡観察で DMV と思われる粒子の検出されない病株を選んでウイルスを分離して実験に用いた。ウイルスの分離やその後の汁液接種試験にあたり、接種源の調製には0.1%チオグリコール酸加用の冷リン酸緩衝液を用い、カーボランダムを使用し、常法どおりの汁液接種を行なった。各種植物からの戻し接種はペチュニア、*Nicotiana glutinosa* などに対して行なった。ウイルス伝搬試験に用いたアザミウマ(未同定スリップス)は畑のタマネギから採集したものであり、ガラス室内で育てたタマネギ上で飼育した幼虫を用いた。これらのアザミウマの幼虫はダリヤの病植物、汁液接種で発病させた *Datura stramonium* 上で2~3日間飼育してから健全なトマト *D. stramonium*, *N. rustica*, ソラマメ苗に移し、3~7日間放飼、または葉にとりつけたゼラチンカプセル中で加害させた。また、*D. stramonium* 病植物上で孵化増殖させた幼虫も供試した。

物理性試験はウイルス源植物に *N. rustica*、検定植物にはタバコ、ペチュニア、*Chenopodium amaranticolor* を用いて常法どおりに行なった。

ウイルス粒子は2%リンタングステン酸(PTA)を用いた DN 法によって試料を作り電子顕微鏡(日立 HS-6, HU-12)を観察した。感染植物の超薄切片像の観察は自然発生ダリヤおよび汁液接種で発病させたトマト、*N. rustica*, *D. stramonium* の病斑部組織について行なった。葉組織小片はクロム・オスミウム液で固定、エタノール脱水、エポン樹脂に包埋して薄切りし、切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色して電子顕微鏡観察した。

実 験 結 果

1. 原寄主の病徴

原寄主 ダリヤ (品種光明) では明瞭なえそ輪紋症状がもっとも顕著な病徴であった。(第 I 図版 A~C)。輪紋斑の大きさは直径数 mm の小形のものから 2cm 程度の大きなものまで種々であり、多重輪紋や幾つかの輪紋が集合したものもみられた。輪紋斑の色は灰白色、褐色、黒褐色のものが認められた。輪紋斑とならずに軽い退緑斑紋病徴のものもみられた (第 I 図版 D)。病植物で茎に黒褐色の激しいえそ条斑が認められるものもあったが、この症状が TSWV によるものかどうかは確認されていない。葉の病徴は 5 月までは極めて明瞭であったが、その後夏には新葉の病徴はうすれ、花色にも斑入りなどの異常はみられなかった。地上部を刈りとった後の再生新芽では秋に、また翌年春同一塊茎から生じた株にもほぼ同様の輪紋症状が認められた。

2. 寄主範囲と病徴

供試ウイルス株の寄生範囲調査の結果を第 1 表にまとめて示した。本ウイルスの寄主範囲は広く、調査した 14 科 44 種の中、8 科 31 種の植物に対して病原性が認められた。主な

第 1 表 ダリヤから分離された TSWV の寄主範囲

全身感染植物	
ナ ス	科: タバコ (サムスン, ホワイトパーレー, キサンチ), <i>Nicotiana glutinosa</i> , <i>N. rustica</i> , <i>N. clevelandii</i> , トマト (ニューグローブ), ナス (早生真黒), トウガラシ (八房), シロバナヨウシュチョウセンアサガオ
キ ク	科: ダリヤ, キク, チジャ (ニューヨーク, ウエヤヘッド), ヤグルマギク, エゾギク, キンセンカ, ヒナギク
マ メ	科: エンドウ (仏国大莢, Wisconsin Perfection), ソラマメ, ナンキンマメ
ア カ ザ	科: ホウレンソウ (ビフロレイ)
ヒ ュ	科: センニチコウ
ノウゼンハレン科: ノウゼンハレン	
局部感染植物	
ウ リ	科: キュウリ (聖護院)
ナ ス	科: ペチュニア, <i>Physalis floridana</i>
キ ク	科: ゴボウ
マ メ	科: ササゲ (ダルマ), カウピー (ブラック), インゲン (マスターピース, 山城黒三度)
ア カ ザ	科: <i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>C. quinoa</i>
ツ ル ナ	科: ツルナ
非感染植物	
キ ク	科: シュンギク, マメ科: スイートピー, アズキ (宝), アルサイクローバ, レッドクローバ, スイートクローバ, アブラナ科: ダイコン (宮重), ハナヤサイ, ナデシコ科: ビジョナデシコ, セリ科: セルリー, ツユクサ科: ツユクサ, アヤメ科: フリジャ, ヒガンバナ科: アマリリス

寄主植物における病徴を以下に記述する。

タバコ（サムスン，ホワイトパーレー，Xanthi）および *N. glutinosa*：接種葉に黒褐色のえそ斑点または輪紋を生じ（第Ⅰ図版G，第Ⅱ図版A），のちに接種葉は枯死する。病徴は接種葉だけに止まり全身感染しない場合もあるが，全身感染した場合には上葉にえそ斑点，茎や葉柄にえそ条斑を生じ，萎縮して枯死するものが多い（第Ⅰ図版H）。

N. rustica：接種葉に灰白色斑点または輪紋を生じ（第Ⅱ図版B），上葉にも同様の病斑を生じる。上葉の病斑が褐色のえそ斑紋となったり，モザイク斑となる場合もある。病植物は萎縮し，枯死することもある。

トマト：接種葉に黒褐色のえそ斑点を生じる。上葉は帯紫褐色の変色からえそ症状となることが多い（第Ⅰ図版E）。茎，葉柄に黒褐色条斑を生じて枯死する場合もあったが，多くは枯死に至らず，萎縮し，のちにモザイク斑を生じる傾向もみられた（第Ⅰ図版F）。

ペチュニア：接種後1～2日で接種葉に黒褐色の局部えそ斑点を生じる。全身感染しない。

ダリヤ：供試した実生苗の接種葉に不鮮明な退緑斑点またはえそ輪点を生じ，上葉にも同様の病徴を生じた。

ヒャクニチソウ：全身感染して葉脈透化からモザイク症状となり萎縮する。

キュウリ：接種葉に退緑斑点または輪点症状をあらわし，全身感染しない。

エンドウおよびソラマメ：接種葉に褐色えそ斑点。上葉にも同様のえそ斑点を生じ，茎に黒褐色条斑えそを生じた株はえ死する（第Ⅱ図版E）。

C. amaranticolor：接種葉に退綠色小斑点を生じ，全身感染しない。

C. quinoa：接種葉に淡褐色のえそ斑点。全身感染しない。

ノウゼンハレン：接種葉，上葉ともに退緑斑とこれにともなうえそ斑点症状を呈し，病植物は萎縮する。

第 2 表 ダリヤから分離された TSWV のアザミウマを用いた伝搬

接 種 源 植 物	接 種 植 物	アザミウマ数		発病株数		接種源植物上 でのアザミウ マ加害日数
		接種植物		接種植物株数		
ダ リ ヤ	{ ト マ ト	1		0/2		3
	{ ソ ラ マ メ	1		0/3		3
<i>Datura</i>	<i>Datura</i>	5		0/4		2
<i>Datura</i>	{ <i>Datura</i>	10		0/5		3
	{ <i>N. rustica</i>	10		0/2		3
ダ リ ヤ	{ ト マ ト	5		1/8		2
	{ ソ ラ マ メ	10		0/2		2
<i>Datura</i>	{ <i>Datura</i>	10		0/4		*
	{ <i>Datura</i>	5		0/4		*
<i>Datura</i>	{ ト マ ト	3		0/2		*
	{ ト マ ト	2		0/10		*

* 病植物上で増殖させた虫を用いた

アザミウマはタマネギ畑から集めたもので未同定

3. 伝 搬

本ウイルスは汁液接種で移すことができる。アブラムシ伝搬の有無はモモアカアブラムシを用いて調べた。あらかじめ60～90分絶食させたアブラムシ10匹ずつを病植物(*D. stramonium*)上で1分、5分、10分、1時間および24時間吸汁させたのち、健全*N. rustica* 苗に移して24時間吸汁させたが、発病は認められなかった。

アザミウマによる伝搬試験の結果を第2表に示した。ウイルス源植物、検定植物を種々に変えて行なった実験は1例を除き伝搬に成功しなかった。伝搬試験で発病が認められた1例はダリヤ病植物上で2日間加害させたアザミウマをトマト苗に5匹ずつ移した場合であり、トマト苗8本中1本に発病が認められ、ウイルスも回収された。

4. 物 理 性

本ウイルスの粗汁液中での物理性調査結果を第3表に示した。このウイルスの耐熱性は低く、ペチュニアを検定植物にした実験では40～45℃、10分、*C. amaranticolor* で調べた場合で45～50℃、10分であった。希釈限度は 10^{-3} ～ 10^{-4} 倍であり、21～23℃での保存限度は1～2時間であった。

第3表 ダリヤから分離された TSWV の粗汁液中での物理性
耐 熱 性

実験	検定植物	対照	処 理 温 度 (°C, 10分間)				
			35	40	45	50	55
A	ペチュニア	187	6	0	0	0	0
B	ペチュニア	331	215	4	0	0	0
	<i>C. amaranticolor</i>	1,541	845	32	7	0	0

保 存 限 度

実験	検定植物	対照	保 存 時 間 (20～23°C, 時間)				
			30分	1	2	3	4
A	タバコ	22	18	1	0	0	0
B	ペチュニア	278	—	6	0	0	0

希 釈 限 度

検定植物	希 釈 (1×)				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
ペチュニア	139	19	2	0	0

検定植物接種葉に生じた局部病斑の合計 (ペチュニア, 10枚, タバコ, 3枚, *C. amaranticolor*, 4枚の葉を供試)

5. ウィルス粒子

病植物から2% PTA による DN 法で試料を作成し電子顕微鏡観察すると、第II図版

F, G, 第Ⅲ図版 A, B のような粒子が観察される。このような粒子は健全植物からは検出されないで、ウイルス粒子と考えられる。試料によってはほぼ球状であり、直径約 70～90nm 前後で外膜をもつもののようにみられる場合もある。しかし、多くの場合、これらの粒子は PTA 中で崩壊しやすいもので、尾が生えたようなもの、双球状のものなど種々に変形したとみられる場合が多かった。多数の粒子が集塊となり、さらにこの粒子塊が膜に包まれているように見える例もしばしば観察された。

6. 超薄切片像

ダリヤ、トマト、*N. rustica*, *D. stramonium* の病植物葉につき、超薄切片像を観察したところ、どの植物でもほぼ同様の所見が得られた。ウイルス粒子は円形または長円形の像を示し、細胞質内に生じた多くの小胞内に数個またはそれ以上の集団となって存在し、さらにこの小胞に囲まれた粒子小集団が多数集まって細胞質内になかなりの部分を占めている場合がよく観察された(第Ⅲ図版 C)。病勢が進行したとみられる一部の細胞では、粒子集団を包んでいる単層膜が消失し、細胞質内に粒子が放出されたとみられる像も認められた(第Ⅳ図版 A)。粒子の切片の拡大像によると、粒子は 2 層の外膜構造をもつものとみられ、切断面の直径が約 70～80nm 前後のものが多かった(第Ⅳ図版 B)。

考 察

本報のウイルスは寄主性が広く、各種のナス科植物その他での病徴が特徴的なえそ症状であること、アブラムシ(モモアカアブラムシ)で移されず、低率ながらアザミウマで伝搬される可能性があること、ウイルスの耐熱性が 50℃ 以下、保存限度が 1～2 時間と極めて不安定であること、ウイルス粒子は外膜構造をもち、PTA 試料中で種々の形をとる大形の粒子であること、感染植物組織の超薄切片像での特異なウイルス粒子存在様式などの実験観察結果から TSWV と同定して差支えないと考えられる。

末次が報告したウイルスに比べると、本報のウイルス株は全般的に病原性がやや弱いようにもみられた。とくに、*N. rustica* やチョウセンアサガオでは全身えそになる場合は少なく、ソラマメ、エンドウなどマメ科植物の感染率は低かった。

アザミウマによる伝搬が認められたのは本報の実験ではわずかに 1 例だけであった。また、本ウイルスが発生したダリヤ畑に隣接してトマトが植えられ、近くの道路べりに自生したクローバにはアザミウマが多数認められたが、ダリヤの生育期間中に行なった数回の観察調査ではダリヤ以外に TSWV の疑いのある病植物を検出することができなかった。これらの実験や観察の結果が、供試したアザミウマが TSWV を伝搬しにくいことを示しているのか、またはウイルス株がアザミウマによって運ばれにくいものなのかは明らかでない。

TSWV の粒子について Best (1964, 1968) は多形性であることを主張し、Myxovirus に似たものとしている。この見解に対しては異論もあり、超薄切片像に見られる粒子断面の所見を裏付けとして、TSWV は径 80～120nm (多くは約 100nm) の球状で 2 層の外膜構造をもつものとする報告も多い。本報の PTA 染色試料では、Best の多形性粒子のうち、亜鈴状などに似た粒子がよく認められたが、これらは PTA 染色によって球状粒子が

崩れたもののように見えた。また、超薄切片像所見を裏づけるかのような膜に包まれた粒子集団も PTA 染色試料でよく観察された。

感染病葉組織の超薄切片観察で認められたウイルス粒子の形態（球状または楕円形で2層の外膜構造をもつ）、所在様式（細胞質内に発達した単層膜小胞内に集団として存在する）は幾つかの植物すべての場合同一であり、諸外国で報告された所見と同様であった（Ie, 1971; Kitajima, 1965; Milne, 1970; van Kammen et al 1966）。

我国のダリヤに TSWV が存在するのではないかと言うことは或程度予測されていたことであるが、被害を生じて病原の確認が行なわれたのは本報告が最初である。TSWV の寄生性の広さからすれば、ダリヤの光明以外の品種、ダリヤ以外の植物に発生する可能性は多いものと考えなければならない。したがって、とくに媒介虫との関連についてはさらに十分な研究を行ない、発生に具える対策の基礎を固めて置く必要があると考えられる。

摘 要

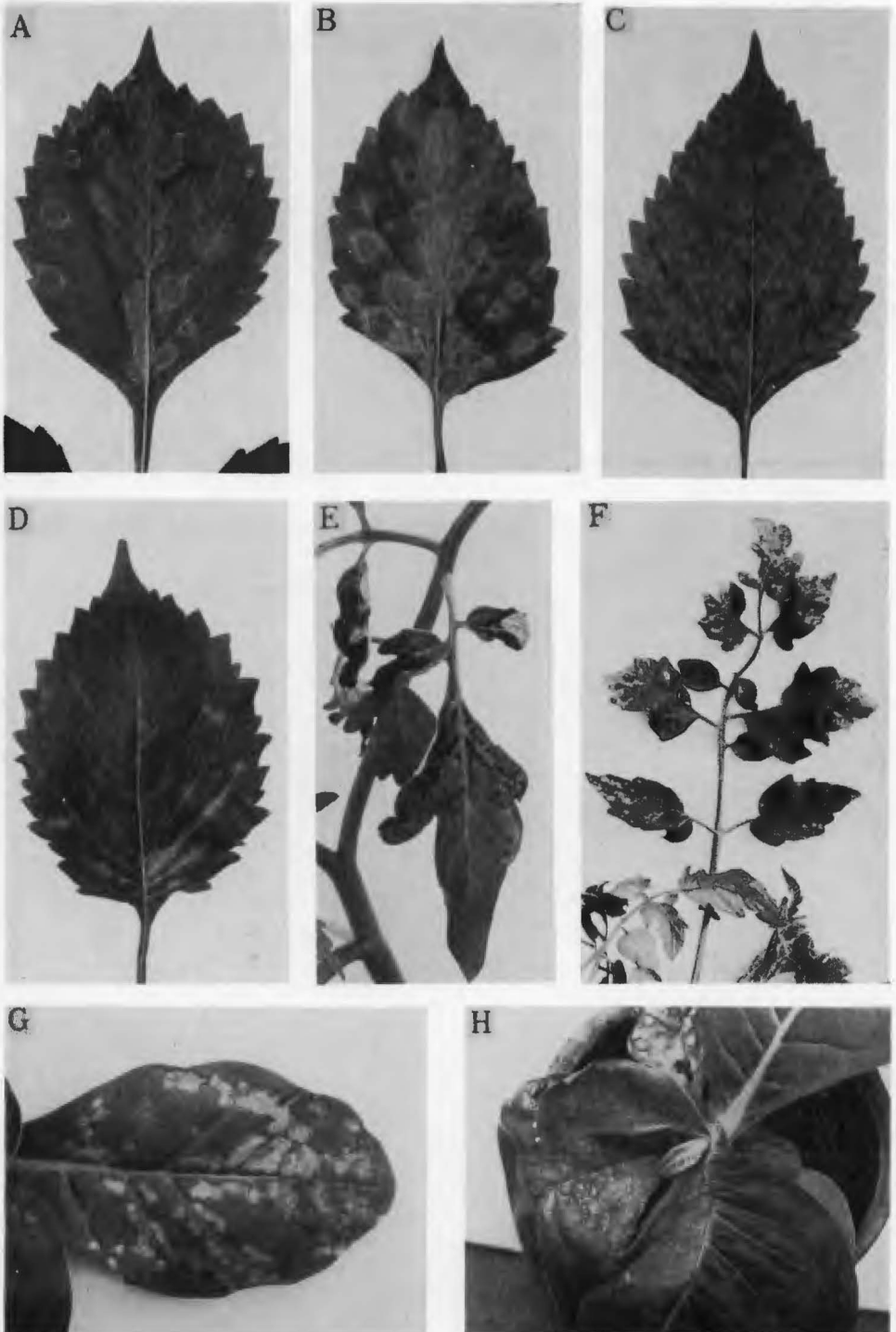
1970年5月にダリヤ（品種光明）のえそ輪紋症状株からウイルスを分離し、Tomato spotted wilt virus (TSWV) と同定した。本報告は国内産の植物で TSWV を確認した記録として最初のものである。

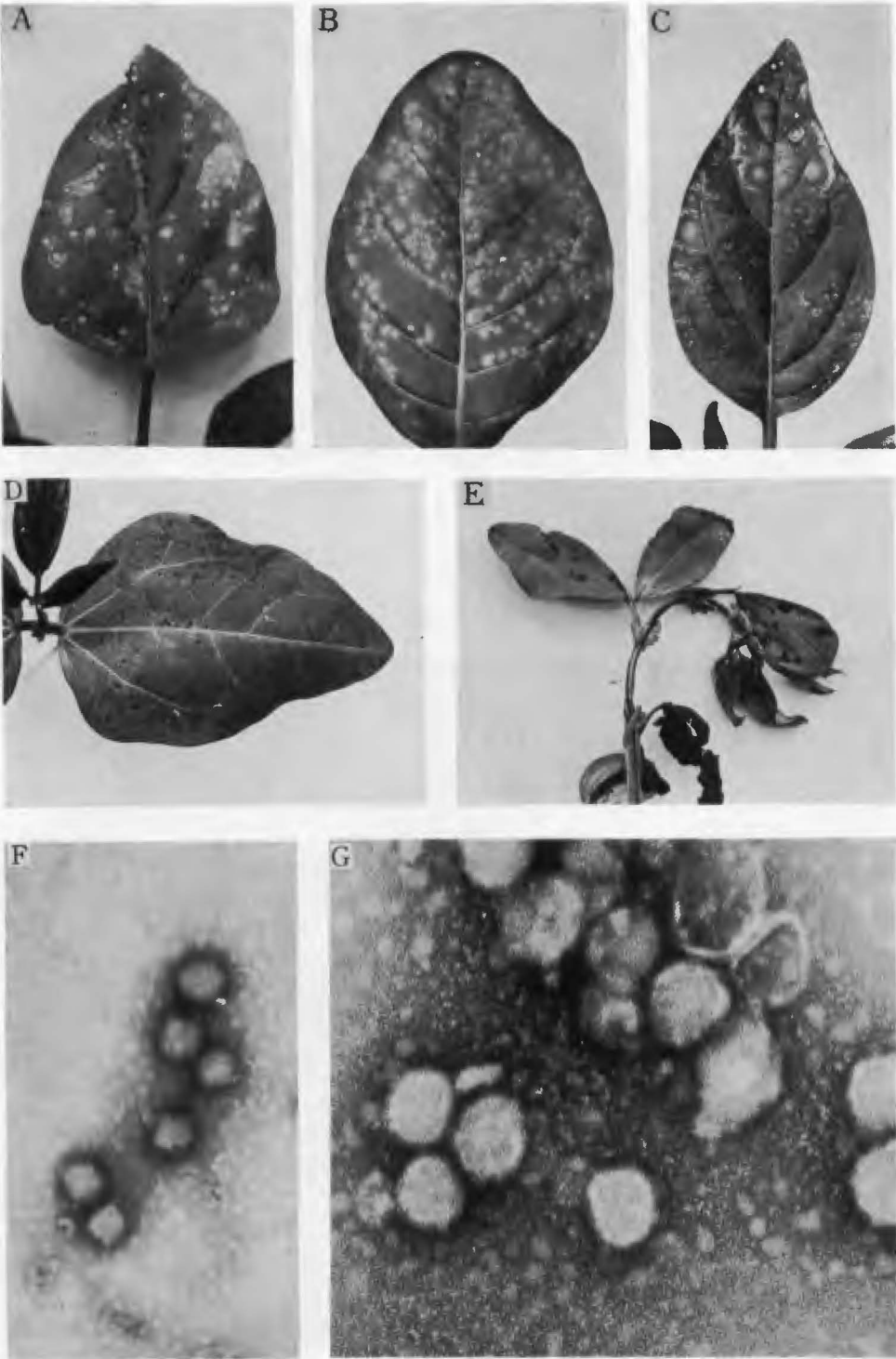
本ウイルスはトマト、タバコ、*Nicotiana glutinosa*、ダリヤその他多数の植物に寄生性が広く、調査した14科44種の中、8科31種の植物に病原性が認められた。病原ウイルスは汁液接種可能であり、モモアカアブラムシでは運ばれなかった。アザミウマ（未同定）を用いた伝搬試験でダリヤ病植物からトマト苗に1例だけ伝搬が認められた。病植物粗汁液中でのウイルスは40～45℃ 10分の加熱、21～23℃ で1～2時間保存によって不活化され、希釈限度は 10^{-3} ～ 10^{-4} 倍であった。PTA染色試料中にみられるウイルス粒子は直径約70～90nm 前後のほぼ球状と認められたが、種々の形に変形したと考えられる粒子や膜に包まれた粒子集団も検出された。病植物葉の超薄切片像に見られるウイルス粒子は円形または長円形であり、2層の外膜構造をもつ。ウイルス粒子は細胞質内に発達した単層膜の小胞内に小集団となって含まれ、しばしばこの粒子集団を含む小胞が多数集まった領域が認められた。

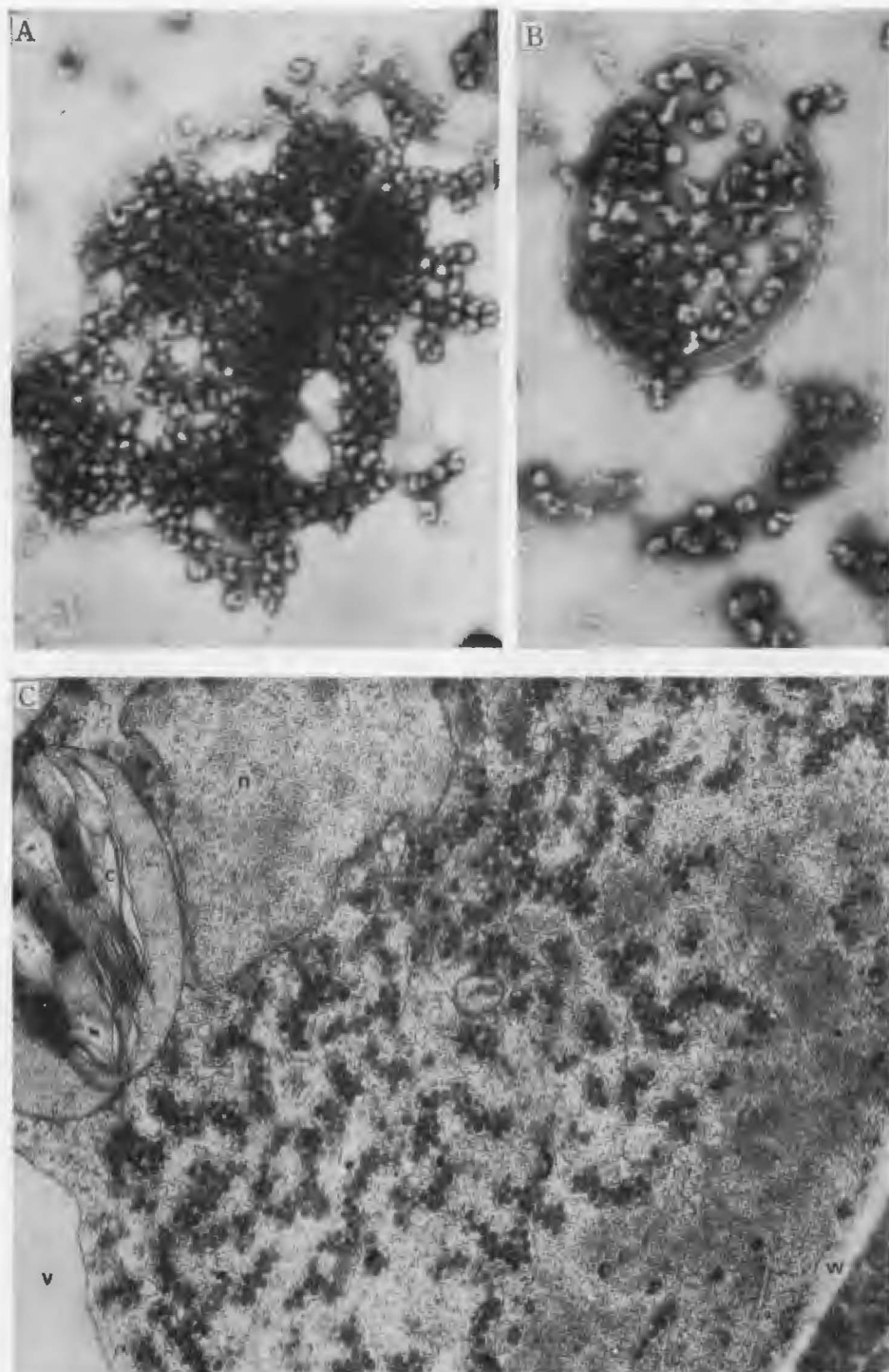
文 献

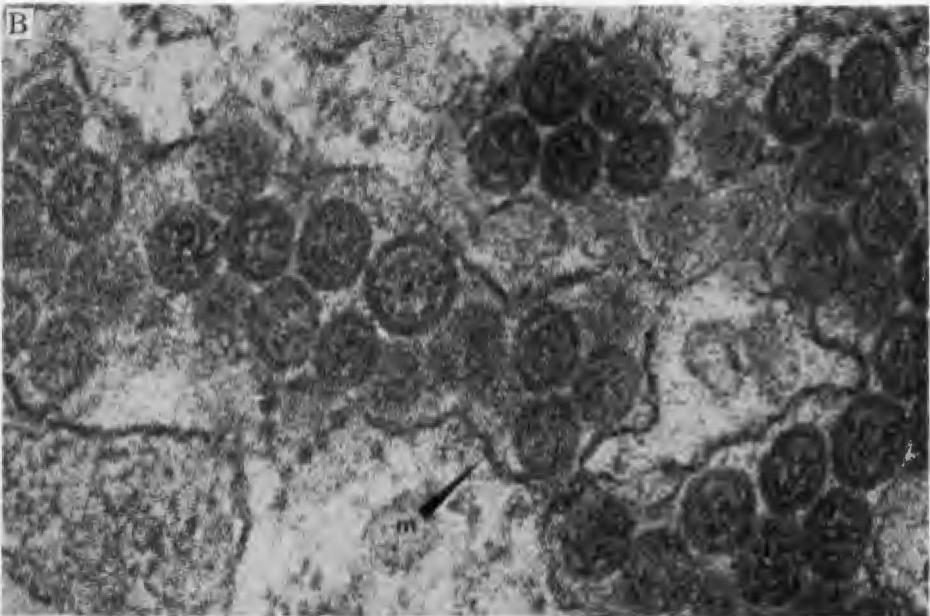
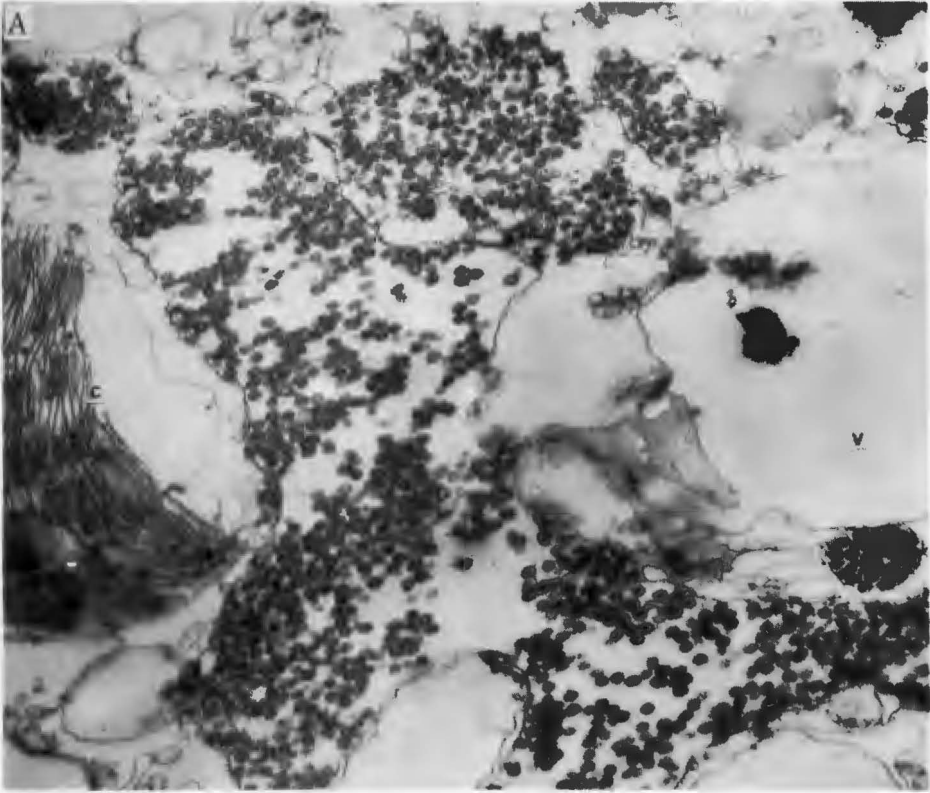
- Bald, J. G. and Samuel, G. 1931. Investigations on "Spotted Wilt" of tomatoes. II. Australian Council Sci. Ind. Res. Bull. 54: 23pp.
- Black, L. M., Brakke, M. K. and Vatter, A. E. 1963. Purification and electron microscopy of tomato spotted-wilt virus. Virology 20: 120—130.
- Best, R. J. 1968. Tomato spotted wilt virus. Advan. Virus Res. 13: 65—146.
- Best, R. P. and Palk, B. A. 1964. Electron microscopy of strain E of tomato spotted wilt virus and comments on its probable biosynthesis. Virology 23: 445—460.
- Brittlebank, C. C. 1919. A new tomato disease— "spotted wilt" Jour. of Agr., Vict. 17: 231—235.
- Ie, T. S. 1971. Electron microscopy of developmental stage of tomato spotted wilt virus in plant cells. Virology 468—479.

- 井上忠男・井上成信 1970. ダリアから分離された Tomato spotted wilt virus 日植病報 36 : 357.
- Kitajima, E. W. 1965. Electron microscopy of vira-cabeca virus (Brazilian tomato spotted wilt virus) within the host cell. Virology 26 : 89—99.
- Martin, M. M. 1964. Purification and electron microscope studies of tomato spotted wilt virus (TSWV) from tomato roots. Virology 22 : 645—649.
- Milne, R. G. 1970. An electron microscope study of tomato spotted wilt virus in sections of infected cells and in negative stain preparations. J. gen. Virol. 6 : 267—276.
- Samuel, G. and Bald, J. G. 1931. *Thrips tabaci* as a vector of plant virus disease. Nature 128. (3229) : 494.
- Smith, K. M. 1931. *Thrips tabaci* Lind. as a vector of plant virus disease. Nature 127 (3214) : 852—853.
- Smith, K. M. 1932. Studies on plant virus diseases. XI. Further experiments with a ringspot virus : Its identification with spotted wilt of the tomato. Ann. appl. Biol. 19 : 305—330.
- 末次哲雄 1967. 輸入検疫中にダリアより発見された Tomato spotted wilt virus について. 日植病報 33 : 345.
- 末次哲雄 1969. 輸入検疫ダリアより発見された Tomato spotted wilt virus. 植物防疫所調査研究報告 7 : 50—56.
- Van Kammen, A., Henstra, S. and Ie, T. S. 1966. Morphology of tomato spotted wilt virus. Virology 30 : 574—577.









図版説明

第 I 図版

- A~D: ダリヤ (品種光明) に発生した tomato spotted wilt virus の病徴
E: TSWV によるトマトの初期病徴, 葉の変色とえそ.
F: TSWV によるトマトの後期病徴, 枯死せずに生き残った株のモザイクおよび変形葉.
G: TSWV によるタバコ (ホワイパーレー) の病徴, 接種葉のえそ斑点.
H: 同上, 全身えそ病徴.

第 II 図版

- A: TSWV による *Nicotiana glutinosa* 接種葉のえそ斑点.
B: TSWV による *N. rustica* 接種葉の灰白色輪紋斑.
C: TSWV による *Datura stramonium* 接種葉のえそ輪紋斑.
D: TSWV によるカウビー (ブラック) 接種葉のえそ斑点.
E: TSWV によるソラマメの全身えそ病徴.
F: TSWV 粒子, PTA による DN 法試料. $\times 66,000$
G: TSWV 粒子, Uranyl formate による negative stain 試料. $\times 150,000$

第 III 図版

- A, B: PTA による DN 法試料中にみられる粒子塊. 種々の形に変形したものとみられる. 膜に包まれた粒子塊とみられるものもある. $\times 30,000$
C: TSWV 感染植物葉の超薄切片で普通にみられるウィルス粒子集団. $\times 20,000$
c: 葉緑体 n: 核 v: 液胞 w: 細胞壁

第 IV 図版

- A: え死前とみられる TSWV 感染葉細胞内のウィルス粒子塊. 粒子小集団を包む膜構造が消失し, 葉緑体 (c) はくずれている. $\times 22,500$
B: 超薄切片中のウィルス粒子小集団. 粒子集団は単層膜 (m) に囲まれ, 粒子に 2 層の外膜構造が認められる. $\times 150,000$